

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification <sup>5</sup> : A61M 25/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 93/10847 (43) International Publication Date: 10 June 1993 (10.06.93)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/US92/10413 (22) International Filing Date: 3 December 1992 (03.12.92) (30) Priority data: 802,891 6 December 1991 (06.12.91) US (71) Applicant: NORTH SHORE UNIVERSITY HOSPITAL RESEARCH CORPORATION [US/US]; 350 Community Drive, Manhasset, NY 11030 (US). (72) Inventor: FARBER, Bruce ; 11 Driftwood Drive, Port Washington, NY 11050 (US). (74) Agents: SINDER, Stuart, J. et al.; Kenyon &amp; Kenyon, One Broadway, New York, NY 10004 (US).</p>		<p>(81) Designated States: AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, UA, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TO).  Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i></p>

(54) Title: METHOD OF REDUCING MEDICAL DEVICE RELATED INFECTIONS

(57) Abstract

The growth of microorganisms on catheters and other medical devices is inhibited by slime-inhibiting compounds. Slime-inhibiting compounds include salicylic acid and other NSAID.

特表平7-505131

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)6月8日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	序内登録番号	F 1
A 61 K 31/50	ADZ	9454-4C	
31/16		9454-4C	
31/19		9454-4C	
31/405		9454-4C	
31/415		9454-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-510339  
 (36) (22) 出願日 平成4年(1992)12月3日  
 (86) 国際文提出日 平成6年(1994)6月6日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US92/10413  
 (87) 国際公開番号 WO93/10847  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)5月10日  
 (31) 優先権主張番号 802,891  
 (32) 優先日 1991年12月6日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ノース・ショアー・ユニバーシティ・ホスピタル・リサーチ・コーポレーション  
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 11030、マンハッセット、コミュニティ・ドライブ 350  
 (72) 発明者 ファーバー、ブルース  
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 11050、ボート・ワシントン、ドリフトウッド・ドライブ 11  
 (74) 代理人 弁護士 錦江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医療装置関連感染の減少方法

## (57) 【要約】

スライム阻害化合物により、カテーテルおよび他の医療装置上での微生物の増殖を阻止する。スライム阻害化合物にはサリチル酸および他のNSAIDが含まれる。

## 請求の範囲

1. 移植可能または挿入可能な医療装置に固着付けられる層を減少させる方法であって、該装置に有効量のスライム阻害化合物を分配することを包含する方法。
2. 前記スライム阻害化合物がキレート剤である請求の範囲第1項記載の方法。
3. 前記スライム阻害化合物がNSAIDである請求の範囲第1項記載の方法。
4. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸(アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドナル、インドメタレン、アセメタシン、シメタレン、スリダクタ、トルメチン、ゾメビラク、ジクロフェナク、フェンチクロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、ボルニブプロフェン、ナプロキセン、キセトプロフェン、フェニブプロフェン、ペナキナプロフェン、インドプロフェン、ビルブプロフェン、カルブプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフルナム酸、トルフェナム酸、フルニキレン、クロニキレン、フェニルブタゾン、フェブタゾン、アパゾン、トリメタゾン、モフェタゾン、セバゾン、スキシブゾン、ピロキシカム、イソキシカムおよびナロキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第3項記載の方法。
5. 前記NSAIDがサリチル酸またはサリチル酸ナトリウムである請求の範囲第4項記載の方法。
6. 前記NSAIDがイブプロフェンである請求の範囲第4項記載の方法。

に取り込まれる請求の範囲第9項記載の方法。

12. 前記装置が、シラステックもしくは他のシリコンペース材料、ポリエチレンテトラレート(PTT)、ポリグラシン、ポリジオキサノン、クロミックガット、ナイロン、シルク、ダクロン、織まれたダクロン、ペロダクロン、ウチ動脈移植片、ポリエチレン(PE)、ポリビニルクロライド(PVC)、シラステックエラストマー、シリコゴム、PMMA[ポリ(メチルメタクリレート)]、ラテックス、ポリプロピレン(PP)、タタン、セルローズ、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)(PEHA)、ポリグリコール、ポリ(アクリロニトリル)(PAN)、フッ素エチレン-コーヘキサフルオロプロピレン(FEP)、テフロン(PTFE)、Cカーボン合金、PVC、ポリウレタン、ポリエステル、ポリチトラフルオロエチレンおよびローゲンのような生物学的ポリマーからなる群より選ばれるポリマーからなる請求の範囲第1項記載の方法。

13. 前記スライム阻害化合物が、装置をスライム阻害化合物を含有するポリマーで被覆することにより分配される請求の範囲第1項記載の方法。

14. 前記ポリマーが親水性を有する請求の範囲第1項記載の方法。

15. 被覆装置上または装置近傍のスライム阻害化合物の前記有効量が約1ないし約76mMである請求の範囲第1項記載の方法。

16. 哺乳動物体内に挿入または移植された医療装置上での

4項記載の方法。

17. 前記スライム阻害化合物は、医療材料の製造過程において該医療材料に取り込まれることにより医療装置に分配される請求の範囲第1項記載の方法。

18. 前記スライム阻害化合物は、PTMMAまたはベンザルコニウムクロライドを用いて前記装置に分配される請求の範囲第1項記載の方法。

19. 前記スライム阻害化合物は、前記装置をスライム阻害化合物を含有する溶液中に浸漬することにより装置に分配される請求の範囲第1項記載の方法。

20. 前記溶液中のスライム阻害化合物の濃度が約1ないし約1Mである請求の範囲第9項記載の方法。

21. 前記浸漬を約10分ないし約24時間行なう請求の範囲第9項記載の方法。

22. 前記溶液がアルコールベースである請求の範囲第9項記載の方法。

23. 前記アルコールが本質的にエタノールからなる請求の範囲第9項記載の方法。

24. 前記浸漬を約-20℃ないし25℃で行なう請求の範囲第9項記載の方法。

25. 前記浸漬を冷却温度で行なう請求の範囲第9項記載の方法。

26. 前記浸漬を-20℃で行なう請求の範囲第9項記載の方法。

27. 前記浸漬の結果、スライム阻害化合物が医療装置材料

微生物の増殖を阻害する方法であって：

該医療装置を、挿入または移植に先立って、約1mMないし約1Mの濃度のスライム阻害化合物を含有する溶液中に晒し；

該医療装置を該溶液から除去し；

該医療装置を乾燥させ；および

該医療装置を哺乳動物体内に挿入または移植することを含む方法。

28. 哺乳動物体内に挿入または移植された医療装置上での微生物の増殖を阻害する方法であって：

該医療装置を、挿入または移植に先立って、約1mMないし約1Mの濃度のスライム阻害化合物を含有するポリマーで被覆し；および

該医療装置を哺乳動物体内に移植または挿入することを含む方法。

29. 前記ポリマーが選択親性を有する請求の範囲第28項記載の方法。

30. 前記ポリマーが、シラステックもしくは他のシリコンペース材料、ポリエチレンテトラレート(PTT)、ポリグラシン、ポリジオキサノン、クロミックガット、ナイロン、シルク、ダクロン、織まれたダクロン、ペロダクロン、ウチ動脈移植片、ポリエチレン(PE)、ポリビニルクロライド(PVC)、シラステックエラストマー、シリコゴム、PMMA[ポリ(メチルメタクリレート)]、ラテックス、ポリプロピレン(PP)、タタン、セルローズ、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)(PEHA)、ポリグリコール、ポリ(アクリロニトリル)(PAN)、フッ素エチレン-コーヘキサフルオロプロピレン(FEP)、テフロン(PTFE)、Cカーボン合金、PVC、ポリウレタン、ポリエステル、ポリチトラフルオロエチレンおよびローゲンのような生物学的ポリマーからなる群より選ばれるポリマーからなる請求の範囲第1項記載の方法。

コラーゲン (F74)、ポリ (ヒドロキシエチルメタクリレート) (F75)、ポリグリコール酸、ポリ (アクリロニトリル) (F76)、フロロエチレン・コ-ヘキサフルオロプロピレン (F77)、テフロン (F78)、C-0-Cr合金、PVC、ポリウレタン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレンおよびコラーゲンのような生物学的ポリマーからなる群より選択される請求の範囲第14項記載の方法。

16. 挿入可能もしくは移植可能な医療装置に関連付けられる感染を減少させる方法であって、挿入もしくは移植に先立って該装置をスライム阻害化合物に曝すことを包含し、この曝が、移植の際の該装置上でその微生物の増殖量を減少させることが可能な量の阻害化合物を装置に接触するに十分ではあるが、全生命の治療利益を喪失するには不十分な量である方法。

17. 前記装置がカテーテルである請求の範囲第16項記載の方法。

18. 移植可能もしくは挿入可能な医療装置に関連付けられる血球凝集を減少させる方法であって、該装置上に有効量のNSAIDを分配することを含む方法。

19. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第18項記載の方法。

20. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第19項記載の方法。

21. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第20項記載の方法。

22. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第21項記載の方法。

23. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第22項記載の方法。

24. 前記NSAIDが、サリチル酸またはそれらの塩である請求の範囲第23項記載の方法。

25. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第24項記載の方法。

26. 挿入可能もしくは移植可能な医療装置であって、表面上に有効量のスライム阻害化合物が分配された装置を具備する医療装置。

27. 前記スライム阻害化合物が約1ないし約20mMのレベルで存在する請求の範囲第26項記載の装置。

28. 前記装置が、シラスティックもしくは他のシリコンベース材料、ポリエチレンテフトラート (F79)、ポリグラシン、ポリジオキサノン、クロミックガット、ナイロン、セルク、ダクロン、織まれたダクロン、ペロダクロン、ウチ動脈移植片、ポリエチレン (F80)、ポリビニルクロライド (F81)、シラスティックエラストマー、シリコンゴム、PMMA [ポリ (メチルメタクリレート)]、ラタックス、ポリプロピレン (F82)、チタン、セルローズ、ポリビニルアルコール (F83)、ポリ (ヒドロキシエチルメタクリレート) (F84)、ポリグリコール酸、ポリ (アクリロニトリル) (F85)、フロロエチレン・コ-ヘキサフルオロプロピレン

29. 前記NSAIDがイブプロフェンである請求の範囲第25項記載の装置。

30. 挿入可能もしくは移植可能な医療装置であって、表面上に有効量のNSAIDが分配された装置を具備する医療装置。

31. 前記NSAIDが約1ないし約20mMのレベルで存在する請求の範囲第30項記載の装置。

32. 前記NSAIDが、サリチル酸、アセチルサリチル酸 (アスピリン)、ビスサリチレート、ベンジル安息香酸、ジフルニサル、フェンドザル、インドメタシン、アセメタシン、シメタシン、スリダク、トルメチン、ゾメピラク、ジクロフェナク、フェンチロフェナク、イソキセバク、イブプロフェン、フルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェニプロフェン、ベニキサプロフェン、インドプロフェン、ビルプロフェン、カルプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、メクロフェナメート、ニフラム酸、トルフェナム酸、フルニキシン、クロニキシン、フェニルブタゾン、フェブゾロン、アバゾン、トリメタゾン、モフェブゾロン、ケブゾン、スネシブゾン、ビロキシカム、イソキシカムおよびチノキシカムからなる群より選ばれる請求の範囲第31項記載の装置。

医療装置関連感染の減少方法

発明の背景

移植可能な装置に加えて、人可能な装置のような侵入性の医療装置の使用に関連付けられる感染の頻発が、文献に詳述されている。カテーテルのような侵入可能な装置の場合には、その感染率のために頻りに取り換えなければならない。移植装置のような移植可能な装置の場合には、感染は装置への感染を妨げる。いずれの場合においても、そのような感染の結果として生命を脅かす敗血症が起こり得る。

医療装置関連感染の病理生理学は複雑である。多くの因子が感染の危険性および重症性に影響を及ぼす。これらには、宿主関連、医療装置関連並びに感染微生物の毒性および接種物に関連する因子が含まれる。数種の医療関連刊物が、これらの因子に寄与する複雑を調査し、文書にしている。医療装置関連感染の危険因子の大部分は、細菌がコロニーを形成し、次いで血流へのアクセスが得られるまで医療装置に付着して移動する場合に発生することが十分承認されている。したがって、細菌の医療装置への粘着能力が、感染を普遍よく確定的なものとするために重要である。

粘着における細菌表面多糖体の役割は十分承認されている。過去12年間にわたって、一連の実験がこれらの多糖体の普遍的な性質を示した。表面多糖体はほとんどの細菌および真菌に見出される。特定のレクチンに行き当たった場合、表面多糖体は細菌の周囲を取り巻き、表面に粘着する膜を生成す

る。この膜は良い多糖体膜の膜からなり、機つかの機能を有しているように思われる。これは細菌の栄養源となり得る。物理的な障壁として成立し得る。最も重要なことには、表面多糖体は細菌細胞の特質的な表面相互作用を決定する。

この現象は広範囲に広がる効果を生じている。例えば、*Streptococcus salivarius* の菌にコロニーを形成する能力、*Streptococcus salivarius* の菌室にコロニーを形成する能力、*Bacteroides fragilis* の菌にコロニーを形成する能力、並びに人肺結核菌の喉および皮膚にコロニーを形成する能力は、全て特定の表面多糖体と、特定の表面多糖体に結合するタンパク質である特定のレクチンとの複合相互作用の発現である。

細菌表面および医療装置関連感染の重要性は、コアブロード特性ブドウ球菌 *S. epidermidis* によって最もよく説明される。この菌は、最も重要かつ普遍的なコマグラード特性ブドウ球菌であり、以前は非病原性微生物であると考えられていた。今や、外來体感染 (foreign body infection) および院内感染の最もありふれた原因であることが明らかとなっている。これは、肺結核心内膜炎、血管移植片感染、人工心臓弁および人工腎臓感染、並びにカテーテル関連敗血症の主要な原因である。この菌は、*S. aureus* より多くの他の細菌よりも毒性は低いものの、パンコマイシンおよびリファンピリンを除くほとんどの抗菌剤に対する高い耐性を有している。

1980年代の初期に、電子顕微鏡を用いた研究により、*S. epidermidis* の特定の株が細胞外スライム様物質を産生す

ることが示された。この細胞外スライムはほとんど多糖体からなる複合物質である。

微生物によるスライムの産生は、それを人可能な移植可能な装置の表面に粘着させ、感染を引き起こすことを可能にする。このスライムは、微生物のポリマーへの付着に介在する、グラウトスに凝む多糖体「接着剤」を含有するように思われる。それはまた、粘着が生じた後、微生物を医療装置に増殖させる。固定する多糖体物質をも含有している。

粘着の他に、このスライムは他の機能を有しているように思われる。それは、パンコマイシンを含むグリコペプチド抗生物質に耐える。これは、ほとんどの *S. epidermidis* 感染が何故抗生物質療法には応答しないのかを説明するであろう。感染が侵入もしくは増殖された装置に発生した場合には、通常抗菌の除去が必要となる。スライムはまた、特定の免疫応答を妨げる。

*S. epidermidis* の細胞外スライムは、実は、表面多糖体の過剰産生の結果である。定量的な産生は、表面の環境に寄与して産生を行ない、かつ止める複雑な機構によって調節されるように思われる。非粘性感染に対する多くの調査の焦点は *S. epidermidis* であるものの、この現象は他の微生物においても研究されている。ポリオおよび他のバイクスの内部でのシールドをマウス尾によるコロニー形成は、歯茎、フェーノール類、4級アミンおよびヨードフォア殺菌剤を含む殺菌剤から微生物を防護する保護層を示している。一度細菌性被膜が形成されると、破壊することは非常に困難である。

抗生物質特性を含有するポリマーの開発は、医療および産業の両者に対して重要な役割を有している。耐菌性多糖体に関連する因子を別として、ポリマーそれ自身に関連する種々の因子と同様に、宿主由来のタンパク質（アルブミン、フィブリン、血小塊）による外來体の覆覆は、疑いなく感染の危険性に影響を及ぼす。

例えば、*S. aureus* 169, 813, *S. aureus* 713, 422 および *S. aureus* 386, 935 に記載されているように、抗生物質特性を有するポリマーからなる、またはこれを用いた医療装置を製造するために、機つかのアプローチが有用なされている。抗生物質耐性、*S. aureus* 935 に記載されているように、製造プロセスの途中で取り込まれるか、または表面にグラフト化することができ。しかしながら、スペクトルの広い抗生物質でさえ、時として耐性微生物の選択を招く。日和見菌、耐性桿菌、抗生物質、*S. epidermidis* および腸球菌の選択も同様である。加えて、抗生物質の「濃度」が急速で、効力で、かつ長期にわたって持続するものでない限り、保護膜の形成をその有効性を妨げるであろう。加えて、多くの抗生物質は、一部の患者においてアレルギー反応を生じせしめる。

この発明は、これに代わるアプローチ、すなわち医療装置のポリマー表面への細菌の粘着の防止に基づく。研究の進展、スライムおよび接着剤産生の両者の程度はシラステック (allstat) カテーテルへの細菌粘着の程度に影響を及ぼし、かつ相関することが示されている。*S. epidermidis* とは異なってスライムを産生せず、かつカ

ーテル関連感染の非常にありふれた原因である。ここに記載するように、細菌によるスライム産生を防ぎ、もしくは減少させる物質は、それらの粘着を減少させ、それにより挿入もしくは移植された装置表面での微生物の増殖レベルを減少させる。

サリチル酸ナトリウムおよび他の特定の化合物は、*Staphylococcus aureus*における菌膜多量体の産生を防ぐことが可能である。サリチル酸塩は、生合成要素が局在する外膜中の脂質に結合する。菌膜多量体は膜形成の基台骨であると主張されている。

この発明の目的は、サリチル酸塩および他の非ステロイド系抗炎症薬（「*NSAID*」）を、キレート剤のような他の化合物と同様に、標的微生物におけるスライムもしくは菌膜多量体の産生を防ぐために用い、それにより医療装置に用いられる物質上でのそれらの粘着および増殖を防ぐことにある。

この発明のさらなる目的は、さらに抗血小管および抗血栓特性を有するスライムまたは菌膜多量体阻害化合物の利用にある。膜衣の形成は部分的には血小管およびフィブリン生成によって決定されるので、これは特に有用である。このような化合物を使用することにより、感染の他に、血栓性静脈炎の発症を減少させることができる。

抗血栓性化合物の化合物を用いて形成された装置上での細菌の増殖を減少させることは、この発明のさらなる目的である。これら並びに他の目的は、以下に詳細に記述されるこの発明によって達成される。

ム、あるいは多量体成分のようなスライムの成分の産生のいずれかを阻害する物質または物質の集合である。スライム阻害剤は、それが阻害するスライムの成分に関わりなく、ポリマー性表面への微生物の粘着能力を減少させる。スライム阻害化合物には、キレート剤の他に、*NSAID*、例えばアセチルサリチル酸（アスピリン）、サリチレート、ビスサリチレート、ペンタリン臭素酸、ジフルオロシド（*difluoride*）、フェンドザル（*fendazole*）、インドメタシン、アセメタリン（*acetaminophen*）、レンメタリン（*lenmetacin*）、スリダグ、トルメチン、ゾメピラク（*zomepirate*）、ジクロフェナク、フェンプロフェン（*fenpropfen*）、イソチセバク（*isotroban*）、イブプロフェン、フルルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フェノプロフェン、ベニキサプロフェン（*benoxaprofen*）、インドプロフェン（*indoprofen*）、ピルプロフェン（*pirtrofen*）、カルプロフェン（*carprofen*）、メブフェナム酸、フルメナム酸、メクロフェナム酸（*meclofenamate*）、ニプロナム酸（*niflumic acid*）、トルフェナム酸（*tolufenamic acid*）、フルニキシン（*flunixin*）、クロニキシン（*clonixin*）、フェルニキシン（*fenfluramine*）、アブソ（*abso*）、トリメタジン（*trimethoprim*）、セフェブタジン（*cefbutaxel*）、ケブソ（*kebsone*）、メキシブソ、ピロキシカム、イソキシカム（*isoxycam*）およびメノキシカム（*menoxycam*）が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ここに要約されるように、装置上挿入され、もしくは移植

## 発明の要約

ここに具現されている通り、前述の、並びに他の目的は、この発明により達成される。この発明は、サリチル酸および他の類似作用性化合物を細菌性スライムまたは菌膜多量体の形成の阻害に用い、それにより侵入性医療装置に粘着し、感染を引き起こすそれらの能力を防ぐことを包含する。

## 発明の経路と説明

ここに記載されるのは、スライム阻害化合物を用いて、他の挿入可能な移植可能な医療装置と同様に、カテーテル上での微生物の粘着および増殖を防止する方法である。そのような微生物によるスライム産生の減少は、医療装置へのそれらの粘着能力を減少させ、それにより感染および腔内敗血症の危険性を減じる。

この発明は、カテーテルおよび他の医療関連外来体への細菌の粘着を阻害することにより、感染および敗血症の危険性を減少させることができる。医療装置が体内に止まることである滞留時間を増加し得るという短見に基づく。医療装置への細菌の粘着は、微生物のスライム産生能力を防ぐ化合物を用いることにより阻害される。ここで用いられる場合には、スライムという用語には、かなりの程度まで細胞外多量体からなり、*Staphylococcus aureus* および *Escherichia coli* のようなグラム陰性桿菌を他の微生物と同様に包含する多くの微生物によって産生される。細胞外および菌膜物質が含まれる。

スライム阻害化合物は、微生物によって産生されるスライ

される装置には、経皮的もしくは穴を通して挿入されたもの、または永久的なものに短期的もしくは長期間にわたって移植されるものも含まれる。そのような装置には、縫合糸、心臓弁、血管もしくは他の組織片のような移植片並びに人工関節面および人工腱のような移植片の他にカテーテルが含まれる。そのような装置は、一般に、シリステックもしくは他のシリコンベース材料、ポリエチレンテトラフルオロ（*PTFE*）、ダクロン、編まれたダクロン、ペロダクロン、ポリダクロン、クロミックゴット（*chromic gut*）、ナイロン、シルク、ウシ動脈移植片、ポリエチレン（*PE*）、ポリウレタン、ポリビニルクロライド、ポリスチレン、ポリスチレンマーマー、シリコンゴム、PMMA（ポリ（メタクリレート））、ラテックス、ポリプロピレン（*PP*）、チタン、セルロース、ポリビニルアルコール（*PVA*）、ポリ（ビニルエチルメタクリレート）（*PEMA*）、ポリグリコール酸、ポリ（アクリロニトリル）（*PAN*）、フロロエチレン-コーヘキサルオロポリビニル（*PEF*）、テフロン（*PTFE*）および  $\text{CO}_2$  重合のようなポリマー性材料からなる。

スライム阻害剤は、その装置上での微生物の増殖を阻害しようとする材料から、吸着、ディッピング、ソーキングにより、あるいは材料それ自身に取り込まれることにより添加することができる。それに代えて、阻害剤を、医療装置表面の膜衣に用いる第2ポリマーに盛り込まれることもできる。そのような第2ポリマーは、阻害剤を装置の薄小領域に徐々に放出することを可能にする選択特性を有していてもよい。

この発明の実施に用いられるスライム阻害剤の幾つかは、さらなる治療特性を有している。したがって、薬向きは移植部位周辺腫瘍を減少させるために、それらを医療用移植片と一緒に用いることがしばしば示唆される。例えば、E.S.

4,753,813 においては、抗腫瘍もしくは麻酔薬としてサリチレートは医療用材料と一緒に用いることが示唆されている。加えて、ここに記載される薬物は、それらの治療特性に薬物透過装置に取り込まれている。しかしながら、そのような装置において用いられる化合物のレベルは、所望の治療結果を得るためには、比較的高くなければならぬ。

反対に、この発明は装置の微小領域内のスライム形成を阻害するためだけに十分なレベルの化合物の使用を要するため。ここに記載される化合物のレベルは全身性治療効果に必要なレベルを下回る。一般に、多細胞生物の発生および養育への粘着を防止するためにここで用いられる阻害剤の量は装置表面の濃度による測定で、約 1ないし約 10mM である。このレベルは、R113 の公報の抗血小板活性から、装置に関連付けられる血栓性凝結の侵入を減少するに十分なものであると信じられる。

好ましい阻害剤の 1 つによると、挿入もしくは移植しようとする装置上への阻害剤の分配は、この装置をスライム阻害剤を含有する前述中でインキュベートすることにより達成される。阻害剤は溶液中、最も好ましくはアルコールベースの溶液中に約 1mM ないし 1M の濃度で溶解する。装置は、このような溶液中において、約 -20℃ ないし 25℃ の温度で約 15 分

間ないし 30 時間インキュベートし、その後空気乾燥する。

好ましくは、約 -20℃ ないし 18℃ でコーティングを行なう。一般に、阻害剤をアルコールと一緒に用いることは多細胞阻害特性を増進することが見出されている。しかしながら、処理しようとする表面がテフロンである場合には、アルコールはスライム阻害剤の有効性を減じ得る。アルコールが用いられる場合には、-20℃ でインキュベートすることによりしばしば最速の結果が得られる。

他の方法では、スライム阻害剤をカテーテルまたは医療装置に結合させるために、トリドデシルメチルアンモニウムクロライド (TDMC) またはベンザルコニウムクロリドが用いられる。TDMC は、以前は、誘生物質およびペラシとと一緒にカテーテルおよび他の医療装置の被覆に用いられていた。

微生物によるスライムの発生を阻害し、それにより医療装置の挿入可能もしくは移植可能な装置上での増殖を阻害する化合物の総力は、幾つかの方法で測定することができる。一座被覆を化合物で被覆し、あるいは装置に化合物を塗布させ、被覆を特定の時間経過後に晒し、その後被覆を洗浄して装置上の細菌の増殖を測定する。そのような測定には、コロニー計数、または細菌存在量測定の手段として特定の代謝物を監視する化学ルミネッセントもしくは生物ルミネッセントアッセイのような、あるいは放射線測定技術による他の微生物定量手段が含まれ得る。

カテーテルまたは他の医療挿入可能もしくは移植可能な装置上での微生物増殖の防止における阻害剤の有効性を分析

する最速の方法は例 1 に記述される。

この出願は機械装置を扱うものではあるが、この概念は多くの産業領域において適用することができる。グラム陰性桿状菌による膜衣形成は、PVC および他の配管供給系において発生する。この膜衣形成は、耐腐性が重要な装置の製造プロセスを汚染することが示されている。そのようなバイアを R113 でコーティングすることによりこの問題を最小にすることができ。

加えて、水中発生源微生物が環境を引き起こす海洋汚染における阻害の適用を考慮することもできる。また、R113 を船舶および他の海洋供給物の防氷およびコーティングの添加剤として使用することもこの発明が意図するところである。

## 例

### 例 1

種々の微生物の増殖特性に対するサリチル酸ナトリウムの効果の研究した。コグラブゼ陰性ブドウ球菌のスライム産生株を、2 種類の異なるタイプの培地、化学的に決定された増殖 (CDM) およびトリカクゼイブプロス (Tribiotic 11 447 11612) (TSB) において、サリチル酸塩の濃度を増加させる条件下で増殖させた。その結果得られた細菌数は以下の通りである。

	CDM	TSB
対 照	$2.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$
1mM	$2.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$
5mM	$5.3 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$
10mM	$5.7 \times 10^5$	$5.3 \times 10^5$
25mM	$2.3 \times 10^5$	$3.2 \times 10^7$

これらの研究は、サリチル酸塩が抗微生物特性を有していないことを示した。サリチル酸塩は、化学的に決定されたトリカクゼイブプロス市販製剤のいずれにおいてもコグラブゼ陰性ブドウ球菌の増殖を阻害しなかった。阻害の増強効果は、*cell* およびシェードマウスを含むグラム陰性桿状菌を用いても得られた。

### 例 2

スライムの発生に影響を与える能力を大まかに測定するために、濃度が増加するサリチル酸塩の存在下において増殖させたトリカクゼイブプロス培養 (*Agglutinin*) からのスライムの収量 (重量) を用いて、サリチル酸塩のスライム産出に影響を及ぼす能力を測定した。

濃 度	収 量
対 照	55 mg
1mM	58 mg
5mM	58 mg
25mM	57 mg

のように、サリチル酸塩の濃度が増加するに従ってスライムの量は減少した。

### 例 3

*S. pyridinifera* によるスライム発生に対するサリチル酸塩の濃度増加の効果を分光光度分析を用いて測定した。結果は以下の通りであった。

濃 度	光学密度
対 照	1.5
1mM	1.4
3mM	1.3
5mM	.5
10mM	.08
25mM	.01

サリチル酸塩の濃度の増加に伴う光学密度の漸進的な低下が、最も明瞭には 5mM 以上で、観測された。

### 例 4

スライム産生コアグラゲ陰性ブドウ球菌の選別された株を (*S. pyridinifera*) を種々の濃度のサリチル酸塩の存在下で増殖させた。増殖の24時間後、種々のタイプのカテーテルを高濃度の微生物中に15分間浸漬した。この検定では、カテーテルを高濃度の微生物の中に短時間浸漬した。このカテーテルを3回洗浄し、標準化された様式でアガー上に転がした。このアガープレートを一晩インキュベートし、コロニーの数を数えた。下記式を用いて粘着性の細菌百分率を算出した。

アルを用いて行なった。結果は以下の通りであった。

濃 度	粘 着 性 (CFU/プレート)		粘 着 性 (CFU/プレート)	
	<i>S. pyridinifera</i>	% 細菌	<i>S. pyridinifera</i>	% 細菌
0	99		232	
1mM	32	84	154	49%
5mM	.5	99	112	61%

これは、*S. coli* および *S. pyridinifera* について、*S. pyridinifera* について観察された効果と同様の効果を示した。

### 例 5

カテーテル断片をサリチル酸中で一晩インキュベートし、サリチル酸塩がポリマー表面を被覆するかどうかを決定するためにサリチル酸塩中でインキュベートしていない対照カテーテルと比較した。

カテーテル断片を 100mM サリチル酸塩中において、37°C、pH 7.8 で一晩インキュベートした。次いで、このカテーテルを乾燥させた。5×10<sup>5</sup> CFU/ml コアグラゲ陰性ブドウ球菌の中に15分間浸漬した。全ての研究は3回行なった。

粘着性 (CFU/プレート)

	対照	サリチル酸塩	阻害
シラスティック	380	312	47%
ポリウレタン	33	20	27%
テフロン	35	13	63%
	17	3	82%
PVC	85	50	41%

% 細菌 = 100 - [(サリチル酸塩中で培養した CFU の数)

/(対照中で培養した CFU の数)] × 100

結果は以下の通りであった。

	粘 着 性 (CFU プレート)		細菌
	濃 度		
ポリウレタン	0	229	
	1mM	235	8.1
	2mM	48	73%
テフロン	0	121	
	1mM	50	71%
	5mM	22	87%
シラスティック	0	325	
	1mM	255	19%
	2mM	149	54%
	25mM	77	76%
PVC	0	370	
	1mM	157	58%
	5mM	85	89%

### 例 5

例 4 において用いた検定と同様の検定を、*S. pyridinifera* および *S. coli* を用いて行なった。これはシラスティックカテー

### 例 7

テフロン、PVC およびシラスティックカテーテルを 100 mM サリチル酸塩中において 37°C で一晩インキュベートし、さらに高濃度の細菌 (10<sup>7</sup> ~ 10<sup>8</sup> CFU/ml) と一緒にインキュベートした。インキュベーションの後、カテーテルを3回洗浄し、アガー上に転がしてインキュベートした。コロニーを計数した。結果は以下の通りであった。

	テフロン	PVC	シラスティック
<i>S. coli</i>			
対照	8.6	13	111
サリチル酸塩	13.5	.9	103
細菌	0%	29%	51%

### *S. pyridinifera*

対照	80	275	58
サリチル酸塩	1	250	5
細菌	100%	27%	94%

細菌は、用いるポリマーのタイプに関わらず、シェードマスをを用いた場合に明白であった。*S. coli* は、カテーテルのタイプに関わらず、シェードマスの場合には粘着しなかった。

### 例 8

例 7 に記載される研究と同様の研究を *S. pyridinifera* のより少量の接種物 (10<sup>5</sup> CFU/ml) を用いて行なった。その結果は以下の通りである。



結果表  
(CFU/プレート) 阻害

テフロン		
対照	147	
サリチル酸塩	54	33%
PVC		
対照	192	
サリチル酸塩	136	30%
シラスティック		
対照	285	
サリチル酸塩	224	24%

#### 例 9

シラスティックおよびポリウレタンカテーテルを、95% E<sub>1</sub> O H および 95% E<sub>2</sub> O H および 139 mM サリチル酸塩中において、pH 7.0、-23℃で 2時間インキュベートした。これらのカテーテルを空気乾燥し、10<sup>5</sup> CFU/ml

*E. coli* 含有するブロスにおいて 37℃で 15 時間インキュベートした。その後、カテーテルを洗浄し、アガー上を転植した。同一の 2 つの実験に対する結果は以下の通りであった。

#### 試行 1

	対照	サリチル酸塩	阻害
ポリウレタン	143	91	35%
シラスティック	481	35	92%

#### 例 12

例 9 に記述される通りに調製したシラスティックカテーテルを *E. coli* 培養物中で 3 日間インキュベートした。

(10<sup>5</sup> CFU/ml)

CFU/プレート

対照	サリチル酸塩	阻害
1400	100	50%

#### 例 13

ポリウレタンおよびシラスティックカテーテルを種々の濃度のエタノール中サリチル酸に -23℃で一晩浸漬し、次いでコアグラゼ能性ブドウ球菌および *E. coli* に 37℃で 4 時間露した。これらを洗浄し、例 9 に記述されるプロトコルに従って転植した。

コアグラゼ能性ブドウ球菌 (ポリウレタン薄片)

	pH	試験/プレート	CFU/mm
対 照	7.33	>400	10.0
サリチル酸塩 100 mM	7.19	319	14.6
サリチル酸塩 400 mM	6.77	59	2.4
イブプロフェン 400 mM	7.22	233	11.5
イブプロフェン 200 mM	7.02	352	18.1

#### 試行 2

	対照	サリチル酸塩	阻害
シラスティック	37	67	90%
PVC	60	50	17%
テフロン	19	20	8%
ポリウレタン	138	57	59%

#### 例 12

例 9 に記述される実験と同様の実験を *E. coli* を用いて行なった。菌懸液の微生物 (10<sup>5</sup>) を用いた。カテーテル断片を 95% エタノール中 139 mM サリチル酸塩において 2 時間インキュベートした。これらのカテーテルを乾燥させ、室温で *E. coli* 培養物中に転植した。これらを 12 時間インキュベートした。結果は以下の通りであった。

(CFU/プレート)

カテーテル	対 照	サリチル酸塩	阻 害
ポリウレタン	77	10	87%
PVC	31	3	88%
シラスティック	50	3	95%

#### 例 11

例 9 に記述される通りに調製したシラスティックカテーテルを *E. coli* 培養物中において 37℃で 3 日間インキュベートした。

CFU/プレート

対 照	サリチル酸塩	阻 害
15	6	60%

#### *E. coli* (シラスティック断片)

	試験/プレート	CFU/mm
対 照	259	12.0
サリチル酸塩 100 mM	226	11.0
サリチル酸塩 400 mM	32	1.6
イブプロフェン 400 mM	238	12.0
イブプロフェン 200 mM	125	9.6

#### 例 14

例 9 に記述される通りにサリチル酸塩およびイブプロフェンで処理したカテーテルを、10<sup>5</sup> CFU/ml の濃度の *E. coli* を含有するリン緩衝生理食塩水中において 37℃で 5 日間インキュベートした。これにより一定濃度の微生物が産生した。

試 験	(CFU/プレート)	阻 害
対 照	240	
100 mM サリチル酸塩	121	50%
100 mM イブプロフェン	70	71%

6 日間のインキュベーションにもかかわらず、培養は印象深いものであった。この実験においては、サリチル酸塩よりもイブプロフェンを用いたほうが善れていた。

#### 例 15

ポリウレタンおよびシラスティックカテーテルを、95% エタノールと一緒にイブプロフェン、アセチルサリチル酸塩、およびベンゾイル安息香酸中で 2 時間インキュベートした。次いで、これらのカテーテルを、例 9 に記述される通りに、

スポンジ状でインキュベートした。結果は以下の通りであった。

ポリウレタン	EPG/プレート	阻害
対 照	255	
アセチルサリチル酸塩 (200mM)	127	57%
サリチル酸塩 (200mM)	179	5%
イブプロフェン (100mM)	166	44%
ベンジル安息香酸 (100mM)	332	8%

シラスティック	EPG/プレート	阻害
対 照	52	
アセチルサリチル酸塩 (200mM)	7	86%
サリチル酸塩 (200mM)	33	36%
ベンジル安息香酸 (100mM)	9	83%

#### 例 16

ポリウレタンカテーテルを67℃で一晩予備加熱し、95%エタノール中において-20℃で下記に挙げる化合物で処理した。次に、これらをコアラゲゼラチンブドウ糖溶液中において37℃で18時間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した。ダイナテック・ホルミノメーター・リーダー (dynatek luminometer reader) において、エクストラライト (extralight) でAIPを抽出し、ファイアライト (firelight) で読み取った。

つかの高感を行なった。前述の通りシラスティックカテーテルを調製し、37℃で45時間インキュベートした。全ての研究は1回行なった。

シラスティックカテーテル	EPG/mM	阻 害
対 照	25.0	
サリチル酸 (200mM)	17.3	31%
サリチル酸 (500mM)	1.5	94%

#### Example 17 (4時間)

シラスティックカテーテル	EPG/mM	阻 害
対 照	14.3	
サリチル酸 (200mM)	4.9	65%
サリチル酸 (500mM)	1.8	87%

#### Example 18 (5時間)

シラスティックカテーテル	EPG/mM	阻 害
対 照	15.5	
サリチル酸 (200mM)	4.8	37%
サリチル酸 (500mM)	2.3	73%

#### 例 18

観察された効果の長さを決定する試みにおいて、シラスティックカテーテルを記述されるようにサリチル酸中でインキュベートした後、無菌の液中に4日間放置した。この期間の後には、カテーテルを取り出して、*Escherichia coli* のブロス培養物中

#### 先ユニット (43° で測定)

対 照	先ユニット
サリチル酸塩	6.2
アセチルサリチル酸塩	1.9
アセトアミノフェン	0.6
イブプロフェン	2.4
フェニルブタゾン	3.2
インドメタシン	0.2
	0.7

先ユニットは、放出されたAIPおよびポリマーに結合している細菌の量を反映している。この実験を、微生物の増殖によりマイクロライトウェル (microtiter well) において直接ではあるが、繰り返した。マイクロライトウェル中で2mM N3A1Dの存在下においてコアラゲゼラチンブドウ糖溶液を増殖させ、洗浄してエクストラライトおよびファイアライトで処理した。

#### 先ユニット (48° で測定)

対 照	先ユニット
アセチルサリチル酸塩	89.0
サリチル酸塩	13.0
イブプロフェン	15.0
アセトアミノフェン	9.0
インドメタシン	198.0
フェニルブタゾン	9.2
	19.1

#### 例 17

グラム陰性杆状菌を用いて、ブロスの代わりに尿中で、幾

に入れた。結果は3回の試行の平均である。

シラスティックカテーテル	EPG/mM	阻 害
対 照	13.2	
サリチル酸 (200mM)	9.6	27%
サリチル酸 (500mM)	2.9	78%

この実験は、カテーテルを水溶液中に入れた直後には阻害が失われることを示した。

#### 例 18

予備的なオーバーナイト培養において1mMの $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $NaCl$ を取り込ませることににより、*Escherichia coli* を成功裏に増殖させた。カテーテル断片をブロス培養物に37℃で一晩培養した。このカテーテルを生体食塩水でよく洗浄し、空気を乾燥して試験のためにシンチレーションバイアルに入れた。

#### Example 19 (2.14°C) を含有する TSS

37℃で一晩

シラスティックカテーテル	EPG
対 照	1483.0
サリチル酸 (200mM)	528.0
サリチル酸 (500mM)	165.0

#### 例 20

他の試験は、カテーテルを乾燥し、かつサリチル酸と結合するトリドペンメチルアンモニウムクロライド (TDMAC) またはベンゼンジニウムクロライドを用いる。予備加熱したシラスティックカテーテルを、室温で48時間、エタノー

水中で約 20 時間 C に置いて装置した。これらのカチオン界面活性剤の水で数回洗浄し、空気乾燥した。次いで、これらの膜片を、エタノール、20% 水溶液サリチル酸水及び 0.08 M サリチル酸に、-10°C で一晩浸漬した。これらのカチオン界面活性剤を、*csp1* または *csp2* のトリプシンカゼイン分解によって除去した。換流生産塩水を 3 回取り替えたカチオン界面活性剤を、3 回洗浄し、エタノール・メタノール・水で洗った。その後、*Agarose-Biotin* アガロゼプレート上に乾かした。このプレートを 37°C で一夜インキュベートし、コロニーを計数した。*csp1* (5 時間インキュベーション)

	CFU/ プレート	CFU /mm	備 考
対 照	143.0	6.5	
サリチル酸 (200mmM)	23.0	1.1	83%
サリチル酸 (500mmM)	1.5	0.02	99%

5. *spidolide* (一環インキュベーション)

	CPU/ プレート	CPU /mm	備 考
対 照	91.0	4.1	
サリチル酸 (200mg/l)	81.0	3.9	9%
サリチル酸 (500mg/l)	52.0	2.6	48%

21

以下は、特定の化合物がスライム発生および医療装置への粘着を阻害するかどうかを決定するためのお勧めの方法である。

10. 残りの 2 cm 断片を、血液アガープレート上で 4 方向にわたって定量的に転がす。このプレートを 37°C で一晚インキュベートし、コロニー数を計数する。

11. CFU/mmの数を算出できるように、カチーテル断片を注意深く測定する。

1. 評価の精度の試験ローテティング構成を調整する。チューブの無菌の 3 cm 長断片を測定する。
2. チューブ断片を無菌培养基において 57℃で一晩インキュベートし、1 時間乾燥した後、-23℃で 2 時間試験溶液および対照に露す。全てのチューブを培養に露出前に接種させる。
3. チューブを取り出し、無菌の場において被覆されたサンプルを記録させる。チューブの末端から 1 cm をマークする。
4. 試験しようとするチューブ内しっかりと浸る無菌の産業用プラスチックシリングを用いて、無菌の 3 cm シリングを組み立てる。
5. 3 cm 及び被覆したチューブのマークした末端に針を取り付け、ブラジリングを約 16 もしくは 36 cm マークまでシリングにも引き上げる。
6. 18% 細菌懸濁液 15 ml を無菌の 50 cc チューブに入れ、各チューブに 3 本までのチューブを入れる。31℃で 15 分間インキュベートする。インキュベーションの長さおよび接種サイズは要することがある。
7. 各チューブ断片を、約 5 ml の無菌生理食塩水を収容する別々の 15 ml 無菌チューブに移す。各々のチューブを、生理食塩水をチューブを通して前後に 3 回攪拌することにより強く洗浄する。
8. 1 本の別々の生理食塩水チューブに貯める場合、3 回の洗浄が完了するまで、このプロセスを繰り返す。
9. 末端がテーパードの 1 cm 断片を切り離して検定する。

國家情報彙報部		Document Information	
CLASSIFICATION OF SOURCE MATTER		REF ID: A67083	
1. <u>SECRET</u>		2. <u>SECRET</u>	
3. <u>CONF</u>		4. <u>CONF</u>	
5. <u>SECRET</u>		6. <u>SECRET</u>	
7. <u>SECRET</u>		8. <u>SECRET</u>	
9. <u>SECRET</u>		10. <u>SECRET</u>	
11. <u>SECRET</u>		12. <u>SECRET</u>	
13. <u>SECRET</u>		14. <u>SECRET</u>	
15. <u>SECRET</u>		16. <u>SECRET</u>	
17. <u>SECRET</u>		18. <u>SECRET</u>	
19. <u>SECRET</u>		20. <u>SECRET</u>	
21. <u>SECRET</u>		22. <u>SECRET</u>	
23. <u>SECRET</u>		24. <u>SECRET</u>	
25. <u>SECRET</u>		26. <u>SECRET</u>	
27. <u>SECRET</u>		28. <u>SECRET</u>	
29. <u>SECRET</u>		30. <u>SECRET</u>	
31. <u>SECRET</u>		32. <u>SECRET</u>	
33. <u>SECRET</u>		34. <u>SECRET</u>	
35. <u>SECRET</u>		36. <u>SECRET</u>	
37. <u>SECRET</u>		38. <u>SECRET</u>	
39. <u>SECRET</u>		40. <u>SECRET</u>	
41. <u>SECRET</u>		42. <u>SECRET</u>	
43. <u>SECRET</u>		44. <u>SECRET</u>	
45. <u>SECRET</u>		46. <u>SECRET</u>	
47. <u>SECRET</u>		48. <u>SECRET</u>	
49. <u>SECRET</u>		50. <u>SECRET</u>	
51. <u>SECRET</u>		52. <u>SECRET</u>	
53. <u>SECRET</u>		54. <u>SECRET</u>	
55. <u>SECRET</u>		56. <u>SECRET</u>	
57. <u>SECRET</u>		58. <u>SECRET</u>	
59. <u>SECRET</u>		60. <u>SECRET</u>	
61. <u>SECRET</u>		62. <u>SECRET</u>	
63. <u>SECRET</u>		64. <u>SECRET</u>	
65. <u>SECRET</u>		66. <u>SECRET</u>	
67. <u>SECRET</u>		68. <u>SECRET</u>	
69. <u>SECRET</u>		70. <u>SECRET</u>	
71. <u>SECRET</u>		72. <u>SECRET</u>	
73. <u>SECRET</u>		74. <u>SECRET</u>	
75. <u>SECRET</u>		76. <u>SECRET</u>	
77. <u>SECRET</u>		78. <u>SECRET</u>	
79. <u>SECRET</u>		80. <u>SECRET</u>	
81. <u>SECRET</u>		82. <u>SECRET</u>	
83. <u>SECRET</u>		84. <u>SECRET</u>	
85. <u>SECRET</u>		86. <u>SECRET</u>	
87. <u>SECRET</u>		88. <u>SECRET</u>	
89. <u>SECRET</u>		90. <u>SECRET</u>	
91. <u>SECRET</u>		92. <u>SECRET</u>	
93. <u>SECRET</u>		94. <u>SECRET</u>	
95. <u>SECRET</u>		96. <u>SECRET</u>	
97. <u>SECRET</u>		98. <u>SECRET</u>	
99. <u>SECRET</u>		100. <u>SECRET</u>	

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内登録番号	FI
A61L 27/00		P 7019-4C	
		U 7019-4C	
29/00		Z 7019-4C	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, K P, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, UA